

Chapitre 7 : biologie moléculaire **les outils de la biologie moléculaire**

Pr. Julien Fauré

Plan et objectifs du cours

Couper ...

Synthétiser...

Marquer ...

... de l'ADN...

Coller ...

Séparer

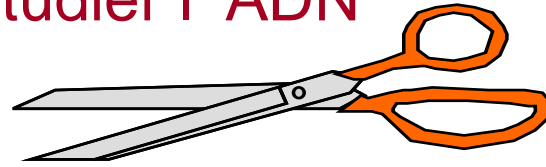
Hybrider ...

Amplifier ...

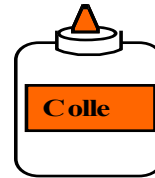
Séquencer ...

Introduction

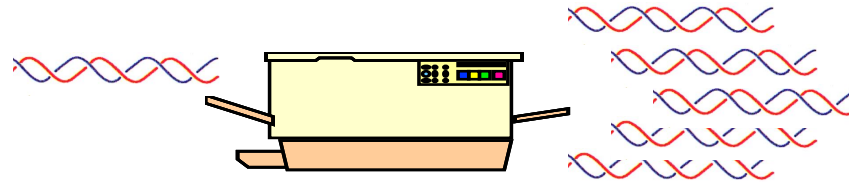
des outils enzymatiques pour étudier l'ADN



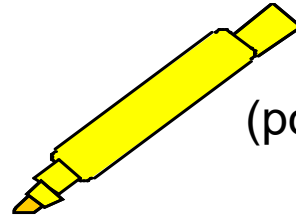
(endonucléases, DNAses...)



(ligases)



(polymérases...)



(polymérases, kinases...)



(polymérases...)

Couper

Enzymes de restriction


- séquences spécifiques de reconnaissance (≈ 4 à 8 bases, palindromes)
- origine bactérienne : Eco RI = **E**scherichia **co**li type **R** souche **I**

- coupures franches

5'---GTTAAC---
---CAATTG---5'



5'---GTT AAC---
---CAA TTG---5'

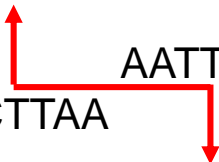


- coupures cohésives

5'---GAATTC---
---CTTAAG---5'



5'---G AATTC---
---CTTAA G---5'



Endonucléases

- DNase I : - ADN double ou simple brin
- nucléase S1: - ADN simple brin
- RNase A (ARN), H (hybrides ARN/ADN)

Synthétiser

Synthèse et copie

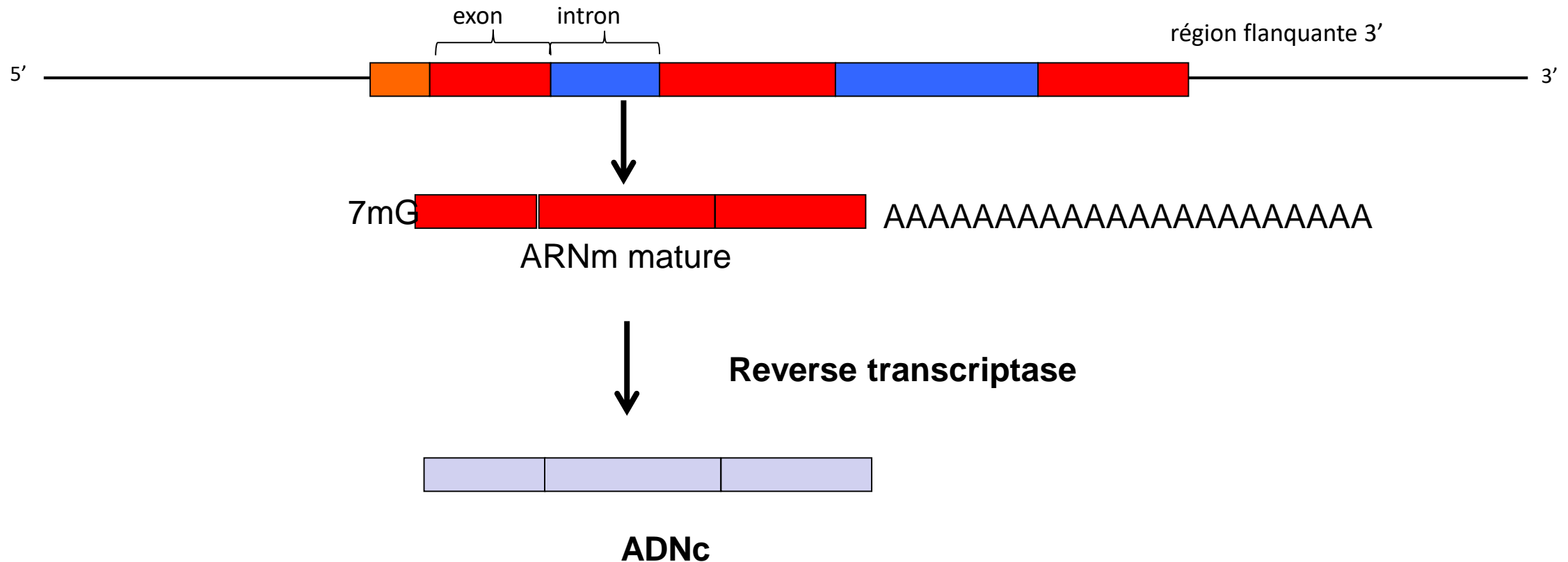
- activité des polymérases : 5' > 3'
- ADN polymérases :
 - produit : ADN
 - matrice : ADN simple brin + amorce ARN ou ADN
 - activités exonucléases 3' - 5' et/ou 5' - 3' exonucléases : + / -
 - polymérases modifiées, thermostables (PCR)
- ARN polymérases :
 - produit : ARN
 - matrice : ADN simple brin
- ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase réverse, inverse) :
 - produit : ADN
 - matrice : ARN + amorce

Synthétiser

- 5'

Création des molécules d'ADN complémentaire (ADNc):

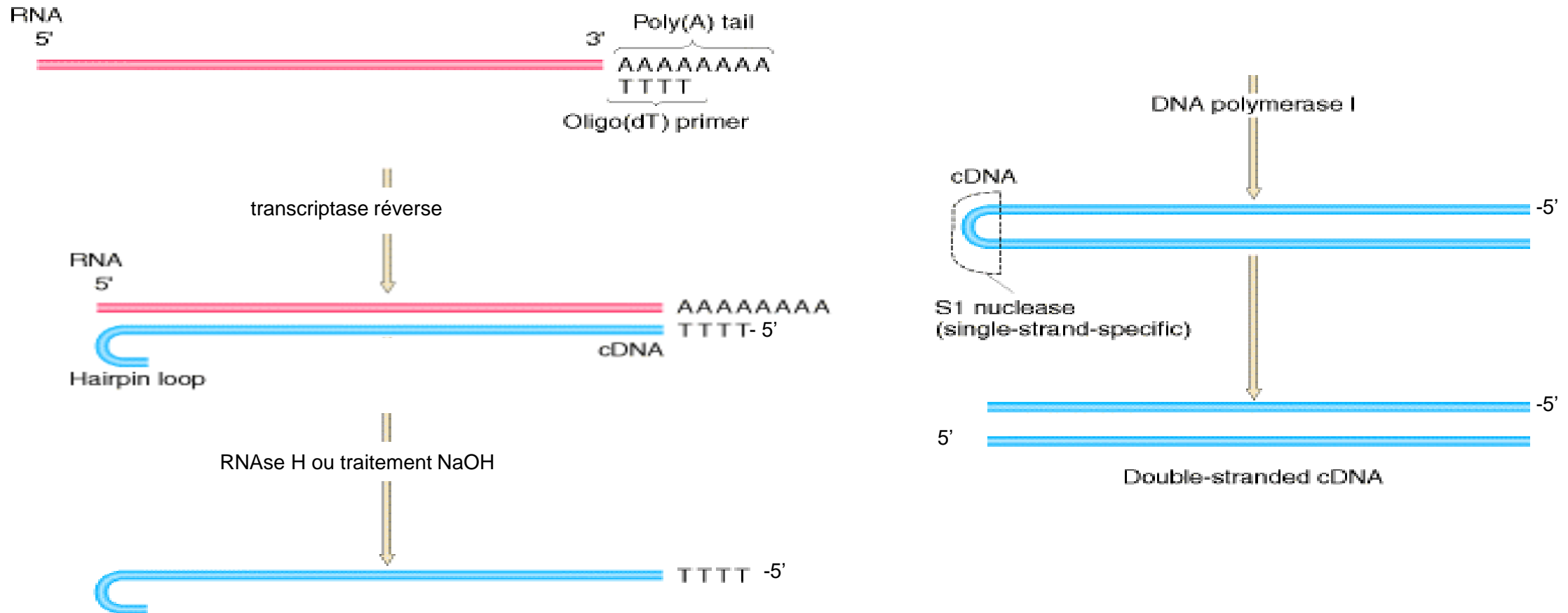
Les molécules d'ARN sont fragiles
Comment récupérer la séquence d'un ARN produit ?



Synthétiser

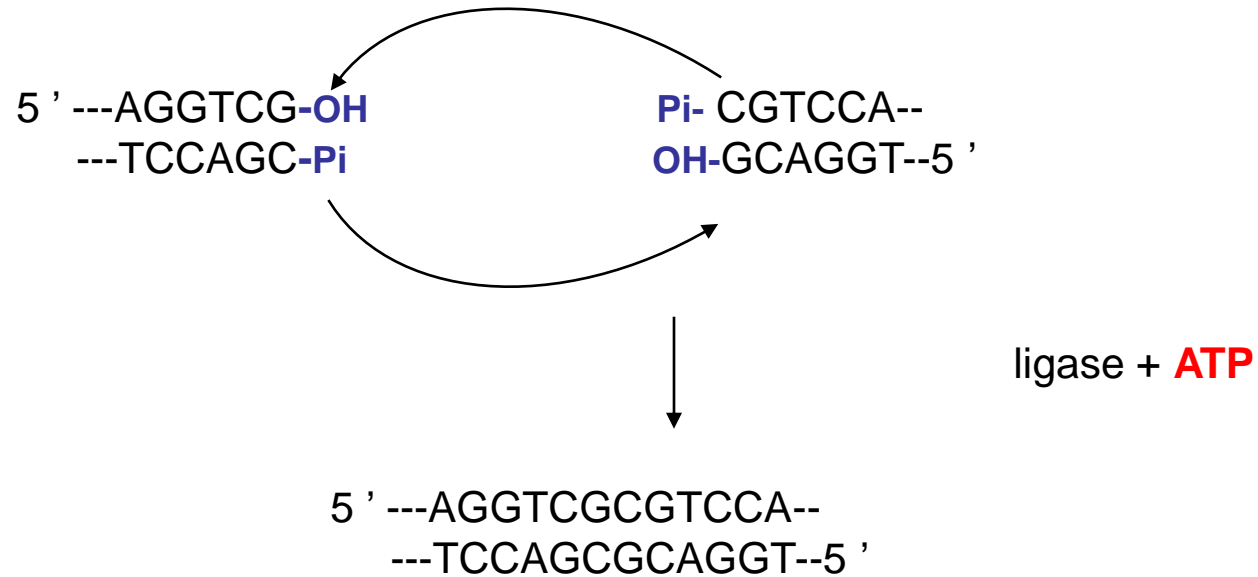
- 5'

Création des molécules d'ADN complémentaire (ADNc)



Coller

- Les ligases catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre un 5' phosphate et un 3'-OH de 2 brins adjacents

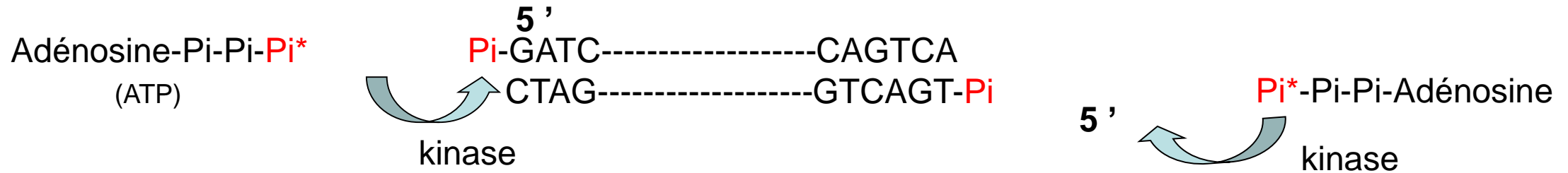


Marquer

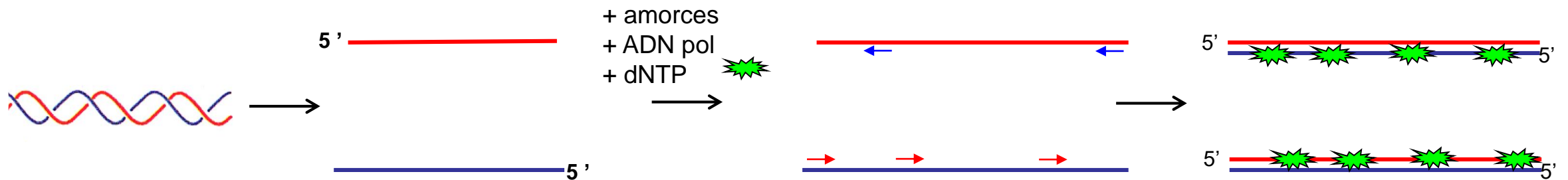
- groupes marqueurs : isotopes (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S), fluorophores...

- marquage aux extrémités

- extrémité 3'-OH : terminal transférase
- extrémité 5'-Pi : ATP- γ ^{32}P & T4-kinase

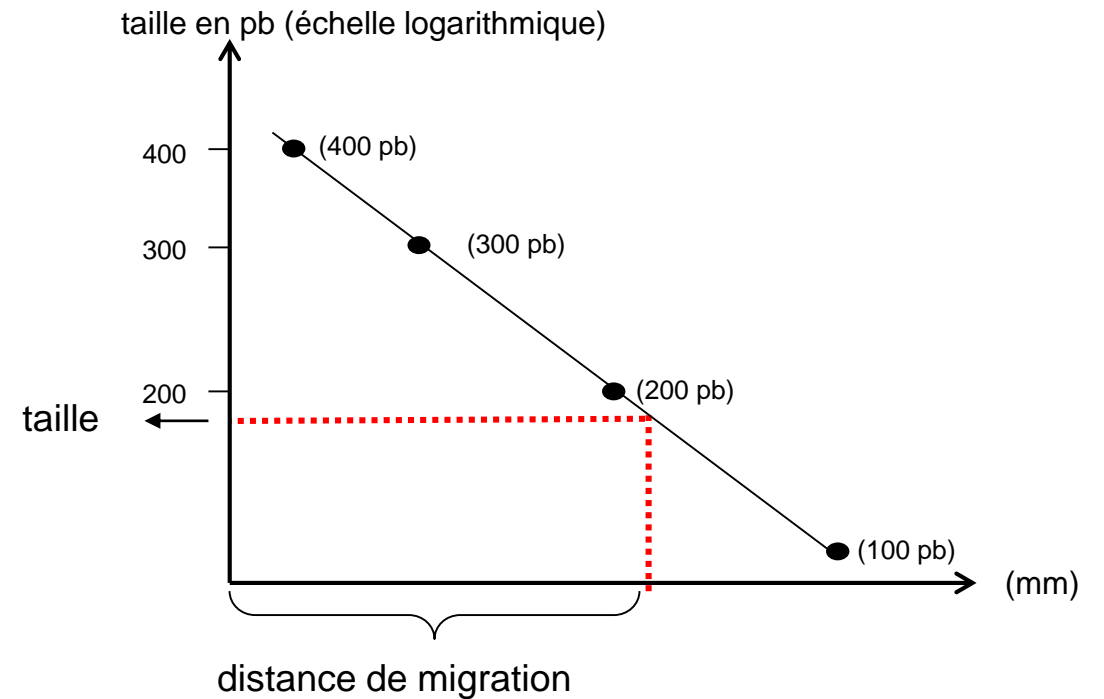
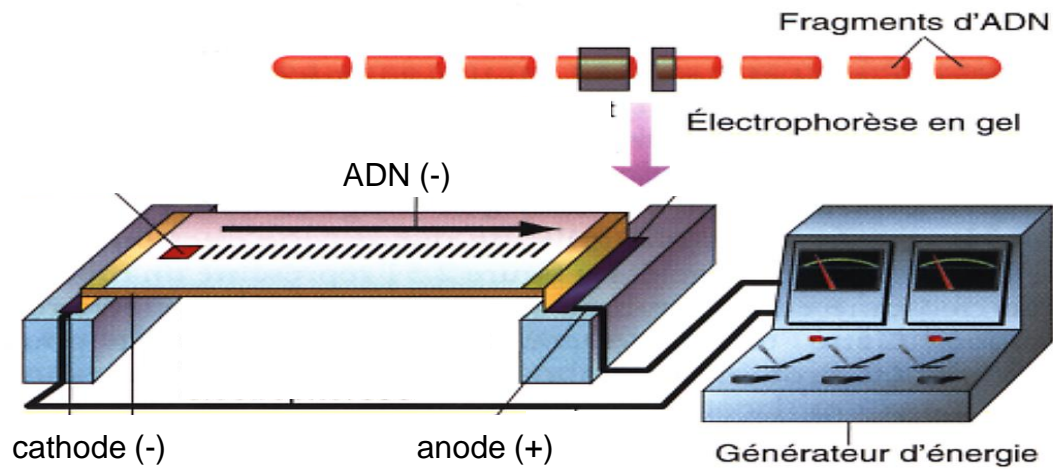


- marquage interne par amorçage aléatoire (random priming)



Séparer des fragments d'ADN

Électrophorèse sur gel (agarose, acrylamide...)

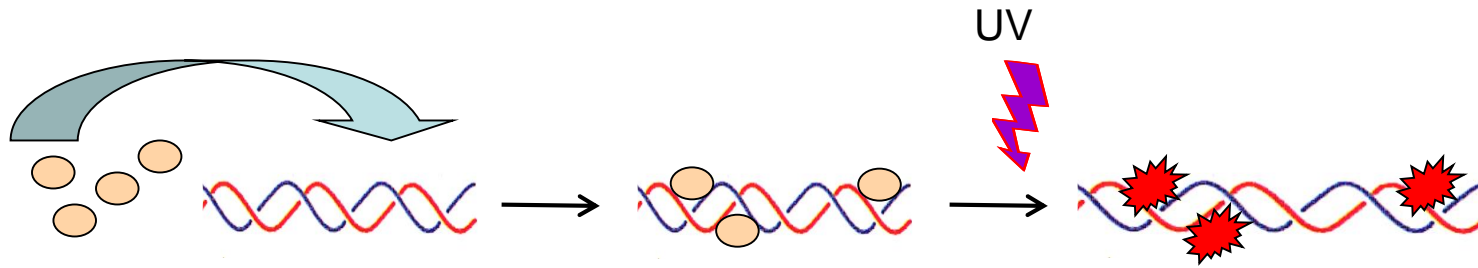


Séparer des fragments d'ADN

Électrophorèse sur gel (agarose, acrylamide...)

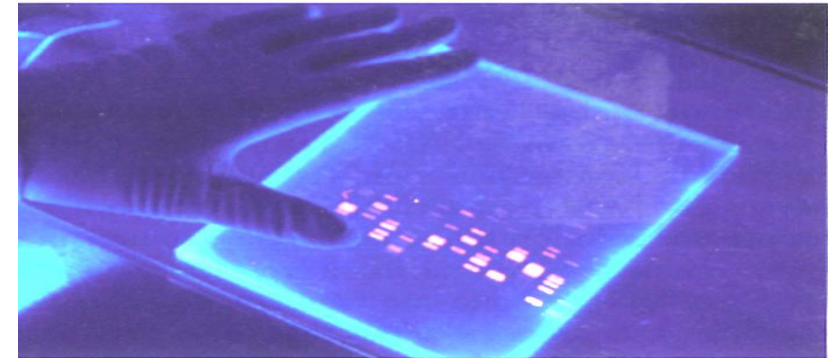
● visualisation de l'ADN

- utilisation de molécules fluorescentes



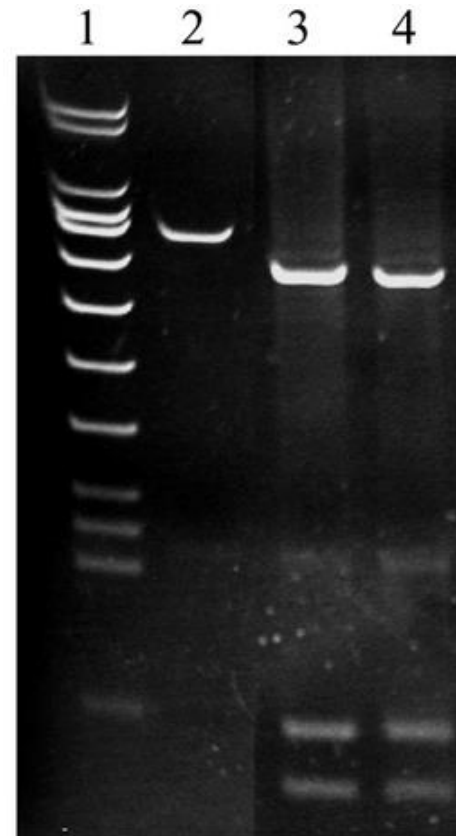
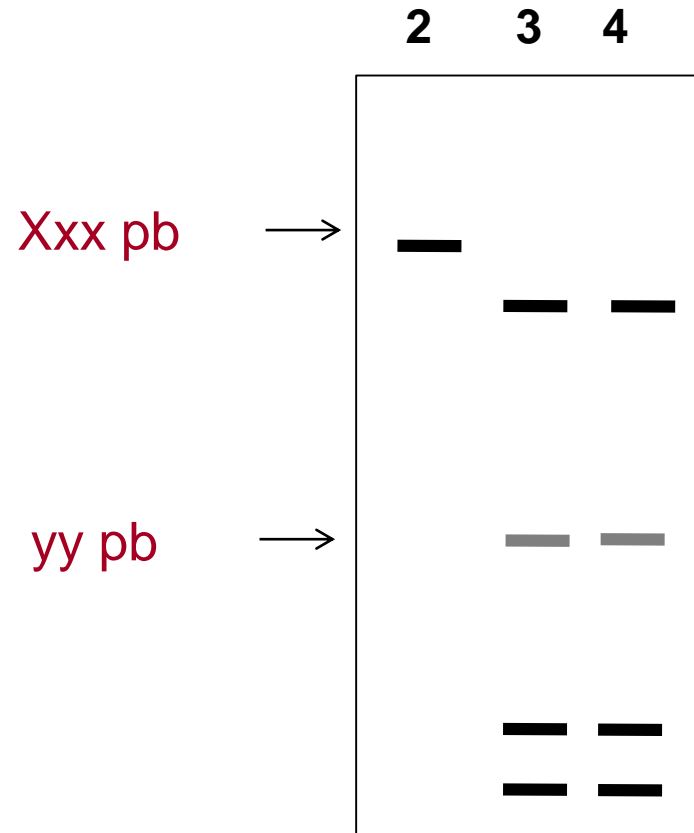
bromure d'éthidium

(molécule intercalante fluorescente)



Séparer des fragments d'ADN

Électrophorèse sur gel (agarose, acrylamide...)



Utilisation du principe d'Hybridation

Sondes moléculaires et hybridation

- hybridation : association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité

5' caggtag~~tc~~~~at~~~~ct~~~~ga~~~~tt~~actgacatgg
gtccatc~~ag~~~~tag~~~~ac~~~~ca~~atgactgtacc 5'

5' caggtag~~tc~~~~at~~~~ct~~~~ga~~~~tt~~actgacatgg

Dénaturation

gtccatc~~ag~~~~tag~~~~ac~~~~ca~~atgactgtacc 5'

5' caggtagggatactgaactgacatgg
gtccatccctatgacttgactgtacc 5'

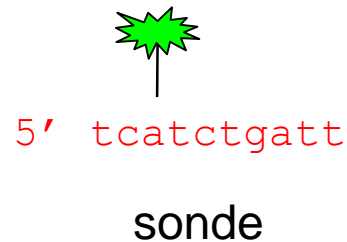
5' caggtagggatactgaactgacatgg

gtccatccctatgacttgactgtacc 5'

Utilisation du principe d'Hybridation

Sondes moléculaires et hybridation

- hybridation : association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité



5' caggtagtcattctgattactgacatgg

gtccatcagtagaccaatgactgtacc 5'

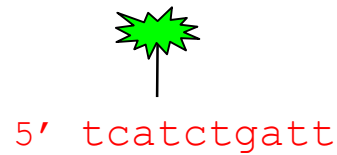
5' caggtagggatactgaactgacatgg

gtccatccctatgacttgactgtacc 5'

Utilisation du principe d'Hybridation

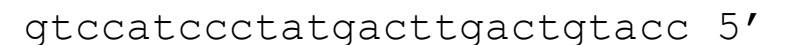
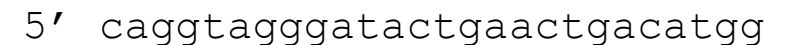
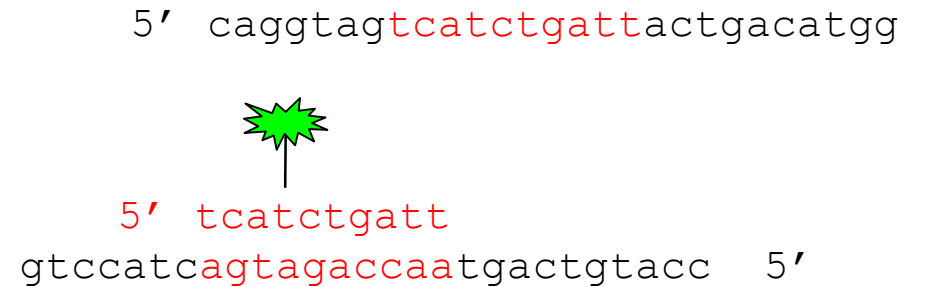
Sondes moléculaires et hybridation

- hybridation : association de 2 séquences d'acides nucléiques sous forme simple brin sur la base de leur complémentarité



sonde

Hybridation
(conditions appropriées)

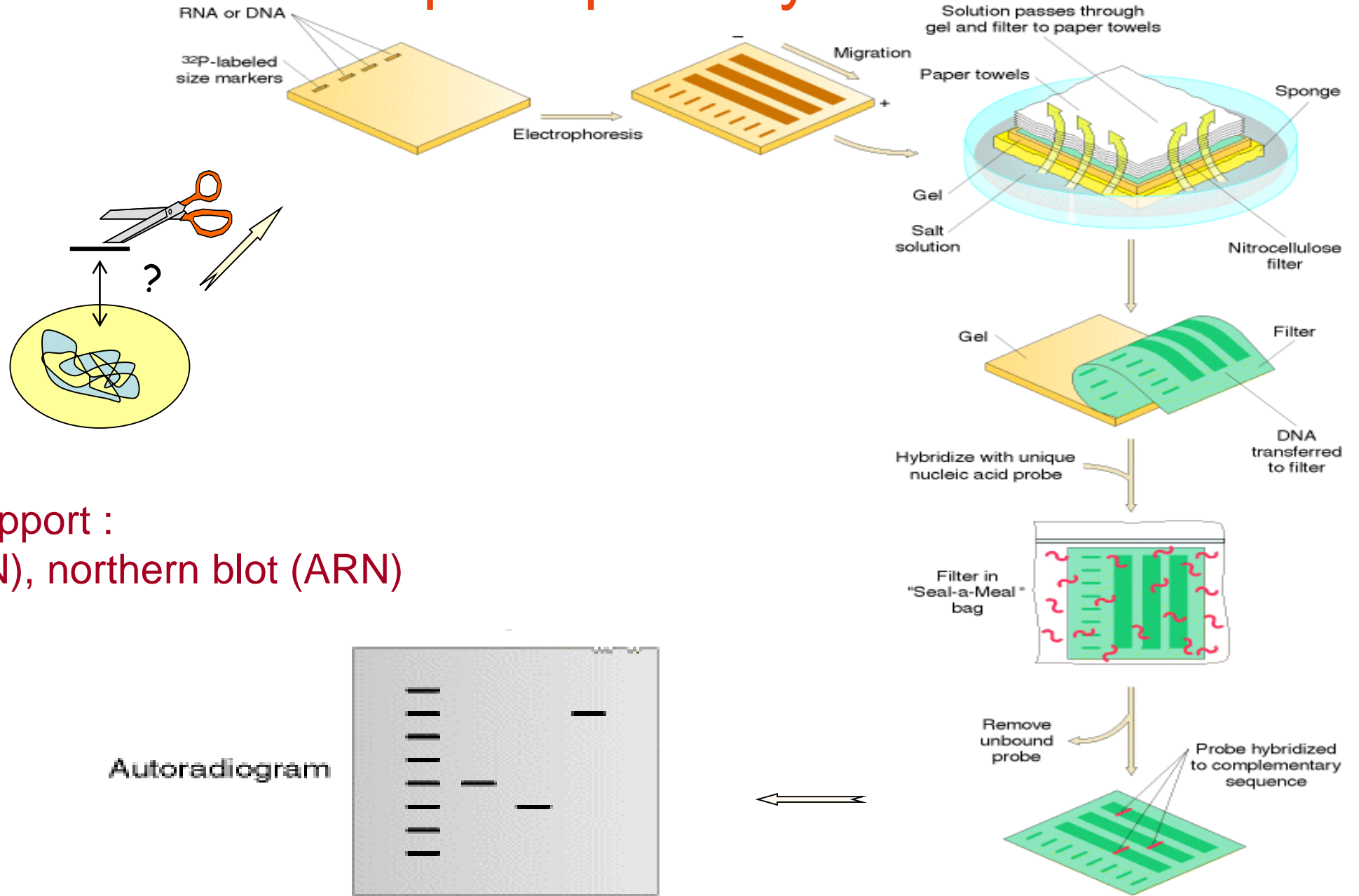


Utilisation du principe d'Hybridation

Sondes moléculaires et hybridation

- sonde : séquence d 'ADN complémentaire de la séquence cible
- facteurs ayant une influence sur l'hybridation
 - la température: la température optimale d'hybridation est en général inférieure au T_m de la sonde
 - la taille des fragments ou des sondes
 - la force ionique: l'hybridation est accélérée en forte concentration saline
 - la nature des hybrides : la stabilité des hybrides (des plus stables aux moins stables est la suivante: ARN/ARN > ARN/ADN > ADN>ADN)
- types de sondes
 - sonde génomique : fragment obtenu par coupure de l'ADN génomique
 - sonde ADNc : sonde ADN obtenue par transcription reverse d 'un ARNm messenger (= séquence codante)
 - sonde oligonucléotides : ADN (ou ARN) simple brin de 18 à 50 nucléotides synthétisé chimiquement

Utilisation du principe d'Hybridation



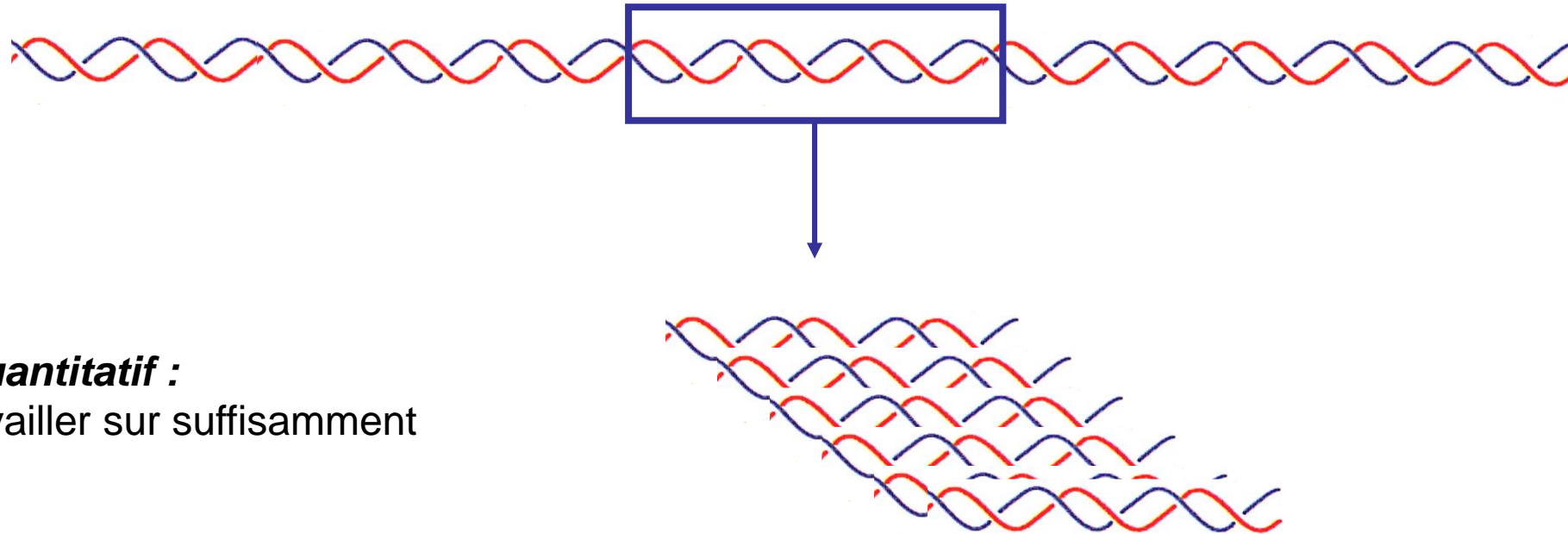
Hybridation sur support :
Southern blot (ADN), northern blot (ARN)

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)

Objectif: amplifier une séquence donnée d'ADN



Objectif quantitatif :
pouvoir travailler sur suffisamment
de matériel

Objectif qualitatif :
pouvoir travailler sur une portion
de génome

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)



ADN à amplifier, la matrice

ADN polymérase thermostable, *Taq*
dNTP

Amorces: oligonucléotides d'environ 20 pb

Thermocycleur

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)



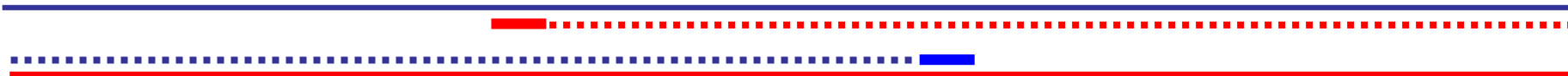
1ere étape : dénaturation à 94° C



2eme étape : hybridation à 55° C (+/-)



3ere étape : polymérisation à 72° C



cycle 1

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)

Les amorces définissent la zone a amplifier

5' --agttactttaatgctgatcgtacgtcgatcg-----gatcgatcgtcgatcgatcgtagctgct--
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

5' --agttacttaatgctgatcgtagctgcgtacgacga-3'
← ctagctagcatcgacga-5'

5' agttacttaatgctga →
--tcaatgaattacgactagcatgcagctagc-----ctagctagcagctagctagcatcgacga-- 5'

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)

1ere étape : dénaturation à 94° C



2eme étape : hybridation a 55° C



3ere étape : polymérisation à 72° C

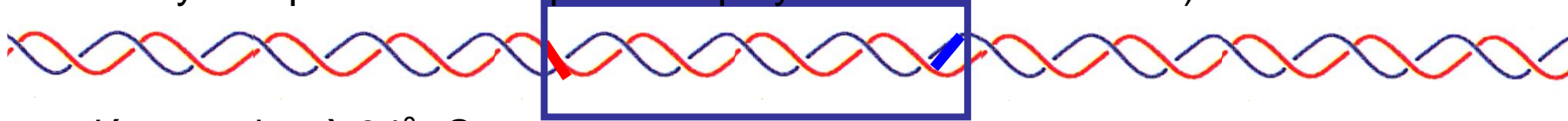


cycle2

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

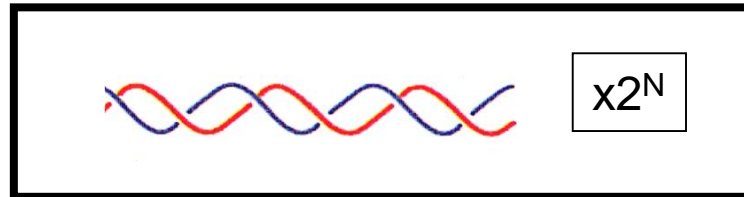
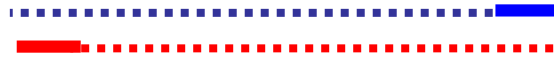
(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)



1ere étape : dénaturation à 94° C

2eme étape : hybridation à 55° C

3ere étape : polymérisation à 72° C



N cycles

Amplification d'ADN

Amplification PCR : polymerase chain reaction

(amplification enzymatique en chaîne par ADN polymérase thermostable)

- Quantification : détermination du nombre de copies cibles initiales

$$= \text{ } \times n \text{ cycles} \longrightarrow A = A_0 \times (1+E)^n \text{ avec } 0 < \mathbf{E} < 1$$

détermination de E (efficacité)

- par PCR « temps réel » où l'amplification est mesurée à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent qui s'incorpore dans le double brin formé
- par utilisation d'un standard interne

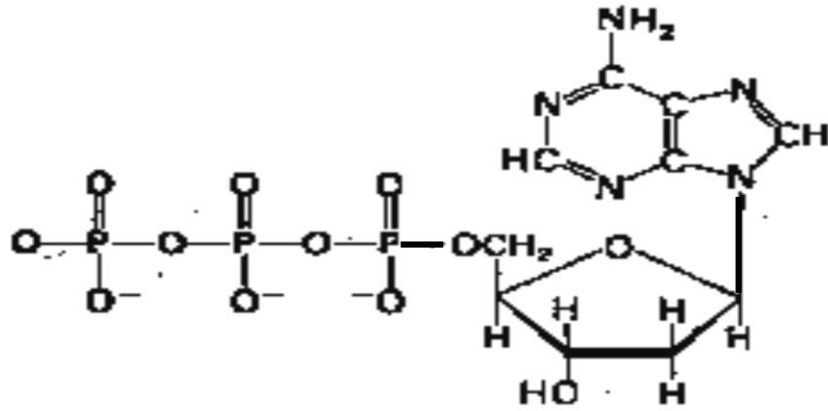
- amplification à partir d'ARN : RT-PCR



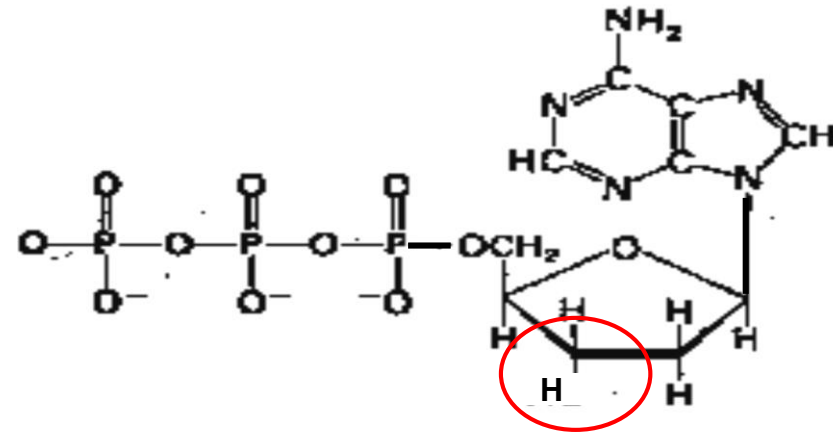
Séquençage d'ADN

Méthode enzymatique (aux di-déoxynucléotides) de Sanger

- matrice ADN
- amorce de séquençage
- ADN polymérase
- dNTP & ddNTP (didéoxy-NTP)



dATP



ddATP

Séquençage d'ADN

5' aatgctgatc gatgctatggctagctagctatcgatcgtatcgtatcgtagcatgatgcta

séparation des 2 brins

+ amorce

+ ADN polymérase

$$+ \left\{ \begin{array}{l} \text{dATP} + 1\% \text{ ddATP} \\ \text{dCTP} + 1\% \text{ ddCTP} \\ \text{dGTP} + 1\% \text{ ddGTP} \\ \text{dTTP} + 1\% \text{ ddTTP} \end{array} \right.$$


← agcatcgtactacgat 5'

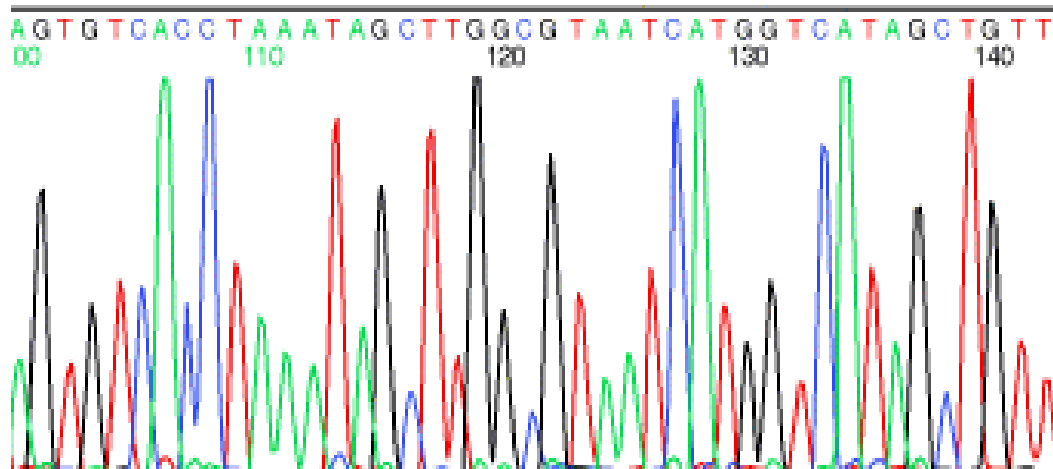
†tagcatcgtagctacgat 5'
 †tagcatcgtagctacgat 5'
 †tagcatcgtagctacgat 5'
 †tagcatcgtagctacgat 5'

séparation par électrophorèse
capillaire des fragments
générés lors de
la réaction de séquençage

visualisation des fragments
portant un ddNTP fluorescent

lumière

détecteur de fluorescence



Électrophérogramme de séquence

5'

Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'Université Grenoble Alpes (UGA).

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Grenoble Alpes (UGA), et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.